

К.П. Кравченко<sup>1</sup>, К.Л. Козлов<sup>1</sup>, А.О. Дробинцева<sup>2</sup>, Д.С. Медведев<sup>1,3</sup>, В.О. Полякова<sup>2,4</sup>

## ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ АПОПТОЗА В КАРДИОМИОЦИТАХ У ПАЦИЕНТОВ С ДИЛАТАЦИОННОЙ КАРДИОМИОПАТИЕЙ

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, 197110, Санкт-Петербург, пр. Динамо, 3; <sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2, e-mail: anna.drobintseva@gmail.com; <sup>3</sup> Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России, 188663, Ленинградская обл., Всеволожский район, г. п. Кузьмоловский, ст. Капитолово, корп. № 93; <sup>4</sup> Белгородский государственный национальный исследовательский университет, 308105, Белгород, ул. Победы, 85

Для понимания патогенеза дилатационной кардиомиопатии (ДКМП) необходимо установить молекулярно-клеточные механизмы старения миокарда, в том числе связанные с программируемой клеточной гибелью, молекулярные механизмы которого практически не изучены. Цель работы — изучение маркеров апоптоза в кардиомиоцитах у пациентов с ДКМП *in vitro*. В работе использовали метод первичных диссоциированных клеточных культур и метод иммунофлуоресцентной конфокальной лазерной микроскопии. Для моделирования клеточного старения использовали клетки 3-го и 14-го пассажей, соответствующие «молодым» и «старым» культурам. На молекулярном уровне старение клеток кардиомиоцитов сопровождалось повышением экспрессии *p16<sup>INK4a</sup>* в 2 раза по сравнению с «молодыми культурами» как в контрольной, так и в группе с ДКМП. Также установлено, что экспрессия *p16<sup>INK4a</sup>* в культурах, взятых от пациентов с патологией, была в 2 раза выше, чем в аналогичных культурах от здоровых пациентов. Экспрессия *p21* была повышена в группе с ДКМП по сравнению с контрольной группой, однако при старении культуры экспрессия *p21* не изменялась, оставаясь на высоком уровне. Наиболее значимые различия были получены при сравнении экспрессии *Bax* в культуре клеток кардиомиоцитов из группы с ДКМП в «молодой» культуре с нормой — в 3,2 раза. Старение клеток миокарда на молекулярном уровне проявлялось в повышении экспрессии белка *Bax*, именно он является запускающим механизмом митохондриального пути апоптоза. Возможно, этот путь клеточной гибели является превалирующим при ДКМП.

**Ключевые слова:** дилатационная кардиомиопатия, старение клеток сердца, регуляторы апоптоза, заболевание сердечной мышцы, молекулярные маркеры

Хронологическое старение характеризуется изменениями межклеточной коммуникации, геномной нестабильностью, эпигенетическими изменениями, укорочением теломер, митохондриальной дисфункцией, истощение пула стволовых клеток и клеточным старением [17].

Дилатационная кардиомиопатия (ДКМП) является заболеванием сердечной мышцы со структурными и функциональными нарушениями миокарда. Клиническая картина определяется левосторонней или бивентрикулярной дилатацией с систолической дисфункцией миокарда при отсутствии факторов гемодинамической перегрузки (гипертензии, пороков клапанов сердца, врожденных аномалий сердца) или коронарной патологии (ИБС) [9]. ДКМП — одна из основных причин сердечной недостаточности, серьезность этой патологии обусловлена преимущественным поражением людей молодого возраста и тем, что чаще всего приводит к необходимости трансплантации сердца [23]. В 2016 г. экспертами Европейской рабочей группы предложено новое определение кардиомиопатии с понятием «клинического континуума ДКМП», включающего промежуточные варианты с изменением фенотипа у носителей мутаций от субклинической формы до полного проявления признаков заболевания [21].

В число причин ДКМП входят: инфекционные причины (как исход миокардита либо развитие на фоне миокардита) — вирусные, бактериальные, грибковые, риккетсиозные, паразитарные (например, при болезни Чагаса); токсические причины — алкогольное поражение сердца, медикаментозные воздействия (антрациклины, доксорубицин и другие), тяжелые металлы (кобальт, ртуть, мышьяк, свинец) [14]. Регулярное употребление алкоголя не менее 80 г/сут в течение более 5 лет часто приводит к дилатации и дисфункции ЛЖ [12].

Распространенность ассоциированных с возрастом заболеваний, в том числе атеросклеротические нарушения или сердечная недостаточность, возрастают при хронологическом старении. Выяв-

лена ведущая роль клеток с маркерами старения в прогрессировании сердечно-сосудистой патологии [24]. К маркерам старения клеток относят: маркеры апоптоза —  $p53$ ,  $p21$ ,  $p16^{INK4a}$ ,  $p38$ ; *МАРК* — маркер старения, индуцированного стрессом;  $\gamma H2AX$  — маркер повреждения ДНК, укорочение теломер, связанная со старением бета-галактозидаза (*SA- $\beta$ -gal*) [4, 5, 7].

В проведенном исследовании для изучения были выбраны маркеры апоптоза. Определяющую роль в процессе старения играет ген супрессора опухолей  $p53$ , однако данный белок хорошо изучен [10, 18], и мы остановились на белках  $p16^{INK4a}$  и  $p21$ , которые тесно с ним ассоциированы. Именно  $p21$  отвечает за  $p53$ -зависимую остановку клеточных делений. Белок  $p21$  ингибирует ключевые регуляторы клеточного цикла — циклинзависимые киназы, а также блокирует репликацию ДНК, связываясь с *PCNA*, что и обуславливает необратимость клеточного старения [15]. Как белок, являющийся основным посредником  $p53$  в остановке клеточного цикла,  $p21$  является важным маркером старения [8]. Кодированные другим локусом (*INK4A-ARF*) белки  $p16^{INK4a}$  и  $p14^{ARF}$  (*ARF*) также представляют собой ключевые регуляторы клеточного старения [6]. Белок  $p16^{INK4a}$ , как и  $p21$ , выступает в роли ингибитора циклинзависимых киназ. Экспрессия  $p16^{INK4a}$  заметно увеличивается с возрастом практически во всех тканях [16]. Это результат активации белка митоген-активируемой протеинкиназы  $p38$  в ответ на оксидативный или генотоксический стресс, которая опосредованно повышает уровень экспрессии  $p16$  [13]. Выбор *Bax* обусловлен его участием в альтернативном пути запуска апоптоза, а именно митохондриальном. Последний развивается при дефиците факторов, обеспечивающих выживаемость клеток (цитокинов и контактных сигналов от соседних клеток), а также под действием цитотоксических агентов (облучение, стероидные гормоны, цитостатики) [22]. *Bax* и *Bak* являются членами семейства *Bcl-2* и основными регуляторами внутреннего пути апоптоза. Под воздействием апоптозных стимулов они активируются и олигомеризуются на внешней мембране митохондрий, чтобы опосредовать ее проницаемость, которая считается ключевым этапом апоптоза [19].

До сих пор остается неизученным, обладают ли кардиомиоциты от пациентов с ДКМП преждевременным фенотипом старения или стареют как обычные клетки. В связи с этим целью исследования явилось изучение маркеров апоптоза в кардиомиоцитах у пациентов с ДКМП *in vitro*.

## Материалы и методы

Для создания культур (диаметр 0,2 см, четыре фрагмента) была забрана ткань миокарда человека от трех пациентов мужского пола среднего возраста ( $52,3 \pm 2,6$  года) с ДКМП при помощи биопсии сердца в Клинике сердечно-сосудистой хирургии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург). Извлечение образцов ткани осуществляли в стерильных условиях на базе операционного блока. Все пациенты подписали информированное согласие.

После получения материала клетки опускали в стерильную емкость, содержащую физиологический раствор. Контрольной служила культура нормальных кардиомиоцитов человека (линия *Girardi Heart*, полученная из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). Культуральная среда для кардиомиоцитов состояла из 86,5% *EMEM*, 10% *FBS*, 1% *NEAA*, 1,5% *HEPES*, 1% *PES*, *L*-глутамин. Все культуры выращивали на протяжении трех пассажей («молодые» клеточные культуры) и 10 пассажей («старые» клеточные культуры). Десятый пассаж был выбран в качестве «старых» культур экспериментально, так как при последующих пересевах большая часть клеток культуры вступала в апоптоз.

Для иммуноцитохимического исследования культур применяли следующие первичные моноклональные антитела:  $p16^{INK4a}$  (1:150, «Abcam», Англия),  $p21$  (1:150, «Abcam», Англия), *Bax* (1:150, «Abcam», Англия). Окрашивание препаратов проводили по стандартному протоколу [2]. Эксперимент был проведен в трех повторностях. В качестве вторичных антител для иммунофлюоресцентной реакции использовали антитела, конъюгированные с флюорохромом Alexa Fluor 647 («Abcam», Англия, 1:1000). Стекла инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте. Ядра клеток докрашивали Hoechst 33258 («Sigma», США). Визуализацию результатов иммунофлюоресцентного окрашивания осуществляли с помощью конфокального микроскопа «Zeiss LSM 980» («Zeiss», Германия).

Для оценки результатов иммуноцитохимического окрашивания проводили морфометрическое исследование с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений Videotest Morphology 5.2 на базе Intel Pentium 5. В каждом случае анализировали пять полей зрения при ув. 200. Экспрессию для маркера с цитоплазматическим действием, а именно *Bax*, оценивали

по площади, равной отношению площади покрытого иммунопозитивными клетками участка к общей площади клеток, расположенных в поле зрения. Для маркеров с ядерным выражением ( $\rho 16^{INK4a}$ ,  $\rho 21$ ) площадь экспрессии рассчитывали как отношение площади участка, содержащего иммунопозитивные ядра, к общей площади ядер, встречающихся в поле зрения. Площадь экспрессии измеряли в процентном отношении.

Для статистической обработки данных использовали программу Statistica 12 (StatSoft), вид распределения определяли с применением критерия Шапиро—Уилка (Shapiro—Wilk's  $W$ -test). Было установлено, что все выборки соответствуют нормальному распределению. Для проверки статистической однородности нескольких выборок были использованы непараметрические процедуры однофакторного дисперсионного анализа (критерий Крускала—Уоллиса). Критический уровень достоверности нулевой гипотезы по критерию Стьюдента (об отсутствии различий) принимали равным 0,05.

### Результаты и обсуждение

Методом иммунофлюоресцентной лазерной конфокальной сканирующей микроскопии исследовали маркеры старения — белки  $\rho 16^{INK4a}$ ,  $\rho 21$  и  $Bax$  в культуре клеток кардиомиоцитов при длительном пассировании, моделирующем старение *in vitro*.

На *рис. 1*, характеризующем «молодую» культуру, большая часть ядер клеток миокарда флуоресцирует синим цветом, что свидетельствует об отсутствии экспрессии в них белка  $\rho 16$ . При этом в «старых» культурах клеток сосудов появляется все больше клеток, иммунопозитивных к белку  $\rho 16^{INK4a}$  и флуоресцирующих красным цветом.

Площадь экспрессии белка  $\rho 16^{INK4a}$  на 3-м пассаже составляла  $6,65 \pm 1,13\%$  в контрольной группе, тогда как в группе с ДКМП выявлено достоверное повышение экспрессии данного маркера ( $13,3 \pm 2,61\%$ ) практически в 2 раза. При анализе уровня экспрессии  $\rho 16^{INK4a}$  при старении клеточной культуры показано, что при ДКМП данный показатель возрастал в 2 раза по сравнению с показателем в контрольной группе (*рис. 2*).

Уровень экспрессии  $\rho 21$  в «молодой» культуре кардиомиоцитов без сердечно-сосудистых патологий был равен  $7,75 \pm 2,16\%$ , в аналогичной «старой» культуре уровень экспрессии исследуемого белка достоверно не изменился и составил  $8,51 \pm 2,63\%$ . В «молодой» культуре кардиомио-

цитов, полученных от пациентов с ДКМП, площадь экспрессии  $\rho 21$  составила  $15,32 \pm 2,06\%$ , что в 1,9 раза больше, чем данный показатель в норме. В «старой» культуре кардиомиоцитов, полученных от пациентов с ДКМП, площадь экспрессии  $\rho 21$  составила  $17,03 \pm 3,44\%$ , что в 2 раза больше нормы.

Уровень экспрессии  $Bax$  в культуре «молодых» кардиомиоцитов в норме составил  $14,43 \pm 3,39\%$ , а в «старых» кардиомиоцитах был в 1,6 раза больше —  $22,76 \pm 3,31\%$  (см. *рис. 2*). При ДКМП площадь экспрессии  $Bax$  в «молодой» культуре была в 2 раза выше по сравнению с нормой и составила  $29,71 \pm 4,20\%$ , а в «старых» культурах — в 2,1 раза выше по сравнению с нормой и была равна  $48,32 \pm 4,54\%$ . При клеточном старении уровень экспрессии  $Bax$  в культуре кардиомиоцитов, полученных от пациентов с ДКМП, возрастал в 1,6 раза.

Для ДКМП хорошо изучены генетические факторы развития болезни, так есть список генов-кандидатов этой болезни, мутации в которых особенно характерны для семейных форм заболевания, однако имеется и приобретенная ДКМП, которая развивается из-за негенетических факторов — болезней и воздействия химических веществ [1]. Частота выявления приобретенной ДКМП увеличивается с возрастом пациентов, таким образом можно проследить связь между развитием болезни и старением организма в целом, поэтому исследование маркеров старения кардиомиоцитов поможет установить новые молекулярные маркеры этой патологии.

В исследовании на культурах кардиомиоцитов показан повышенный уровень экспрессии  $\rho 21$  как в молодых культурах, так и при старении при ДКМП. По данным литературы известно, что уменьшение количества  $\rho 21$  в клетке приводит к наступлению фазы G1, то есть в клетке начинается подготовка к митотическому делению. Снижение экспрессии или активности  $\rho 21$  повышает способности организма к регенерации тканей [11]. Таким образом, повышенная экспрессия  $\rho 21$  свидетельствует о сниженном регенеративном потенциале сердечной мышцы у больных с ДКМП. Так, даже в «молодых» культурах зафиксирован повышенный уровень экспрессии данного маркера.

Ранее в исследовании на 170 здоровых донорах было показано, что концентрация протеина  $\rho 16^{INK4a}$  в крови возрастает при увеличении биологического возраста и неблагоприятных экзогенных воздействиях [16]. В нашем исследовании на кар-

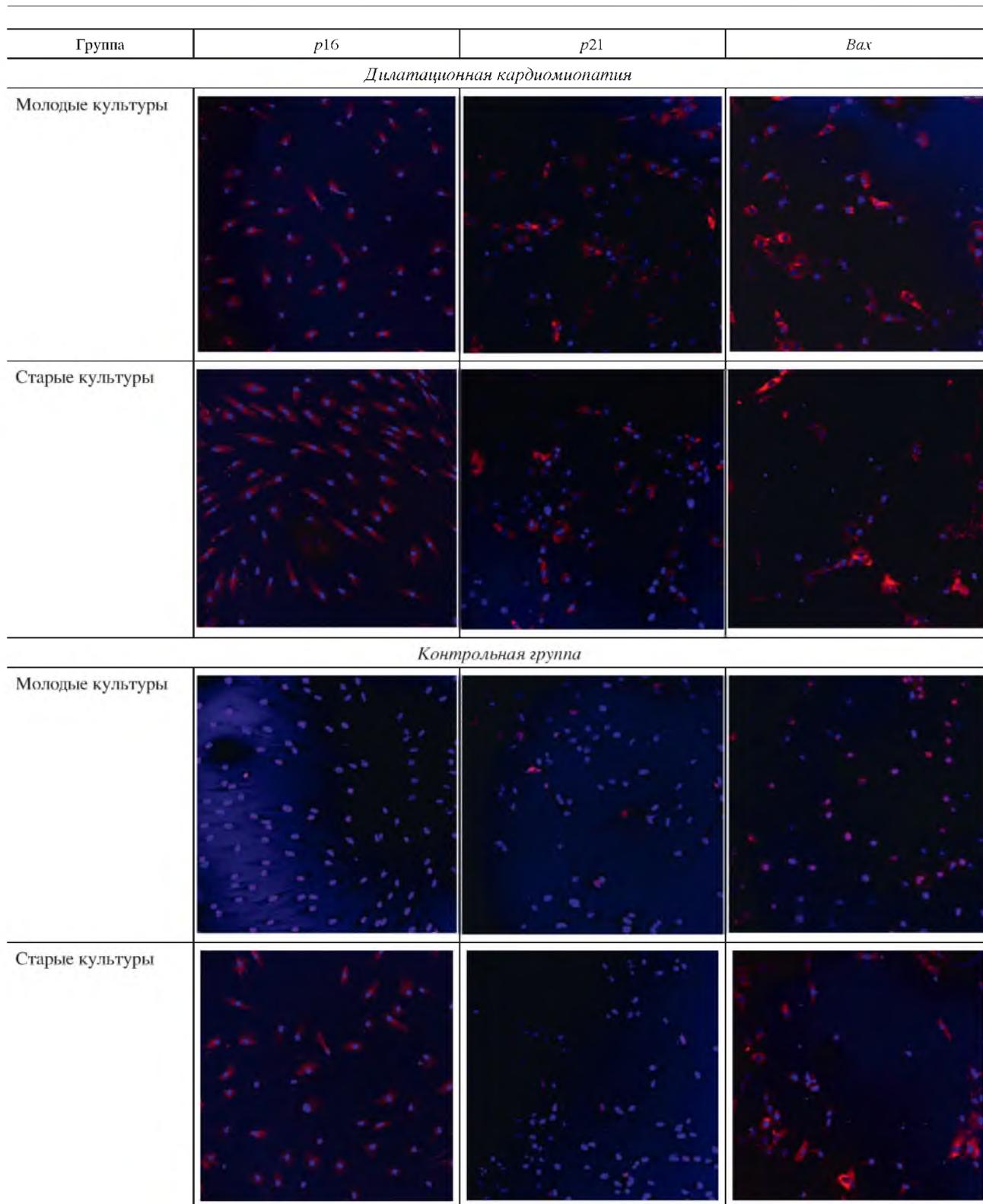


Рис. 1. Микрофотографии культуры клеток кардиомиоцитов, окрашенных с применением антител к  $p16$ ,  $p21$ ,  $Vax$ , в контрольной группе и при дилатационной кардиомиопатии (лазерная конфокальная сканирующая микроскопия)

диомиоцитах мы получили аналогичную картину, при старении клеточной культуры экспрессия  $p16$  увеличивалась, особенно выраженным это увеличение было в группе с ДКМП. Также установлено, что экспрессия  $p16^{INK4a}$  возрастает при повреж-

дении теломер. X. Zhang и соавт. [25] провели эксперимент, в котором блокировали экспрессию  $p16^{INK4a}$  в клеточных культурах мыши с поврежденными теломерами. В результате эксперимента выяснилось, что при контроле работы гена  $p16^{INK4a}$

можно продлить существование клеток с поврежденными теломерами. Известно, что гиперэкспрессия  $p16^{INK4a}$  приводит к остановке клеточного цикла при переходе от S- к G2-фазе и в дальнейшем может приводить к апоптозу и преждевременной гибели клеток с поврежденными теломерами [3].

В исследовании М.Н. Но и соавт. на крысах было показано, что на молекулярном уровне старение клеток миокарда проявлялось в повышении экспрессии белка *Bax*, именно он является запускающим механизмом митохондриального пути апоптоза [19]. Функциональная роль белка *Bax* состоит в димеризации с белком *Bak* и образовании пор в митохондриальной мембране, инициации последующих этапов внутреннего пути запуска апоптозного каскада [20]. Следует отметить, что в культурах кардиомиоцитов из группы с ДКМП экспрессия *Bax* была существенно выше, чем в культуре кардиомиоцитов, полученных от здоровых доноров. Таким образом, можно предположить, что при ДКМП именно внутренний путь запуска апоптоза является преобладающим.

### Заключение

Старение клеток миокарда *in vitro* в большей степени реализуется через сигнальный каскад белка *Bax*, а именно он является запускающим механизмом митохондриального пути апоптоза, и в меньшей степени — при участии другого каскада, реализуемого протеинами  $p16$  и  $p21$ . Понимание патогенеза ДКМП на молекулярном уровне, наряду с диагностическими возможностями, открывает новые перспективы не только для персонализированной медицины, но и для разработки новых лечебных стратегий.

Конфликт интересов отсутствует.

### Литература

1. Вайханская Т.Г., Сивицкая Л.Н., Курушко Т.В., и др. Дилатационная кардиомиопатия: новый взгляд на проблему // Рос. кардиол. журн. 2019. № 4. С. 35–47. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2019-4-35-47>
2. Клейменова Т.С., Дробинцева А.О., Полякова В.О., Цыпурдеева А.А. Экспрессия кисспептина и матриксных металлопротеиназ в культуре эндометрия человека: исследование инвазивных и миграционных свойств // Журн. акуш. и жен. болезней. 2019. Т. 68. № 2. С. 43–50. <https://doi.org/10.17816/JOWD68243-50>
3. Anderson R., Lagnado A., Maggiorani D. et al. Length-independent telomere damage drives post-mitotic cardiomyocyte senescence // EMBO J. 2019. Vol. 38. № 5. e100492. <https://doi.org/10.15252/embj.2018100492>
4. Anderson R., Richardson G.D., Passos J.F. Mechanisms driving the ageing heart // Exp. Gerontol. 2018. Vol. 109. P. 5–15.
5. Borodkina A.V., Shatrova A.N., Nikolsky N.N., Burova E.B. Role of p38MAP-kinase in the stress-induced senescence

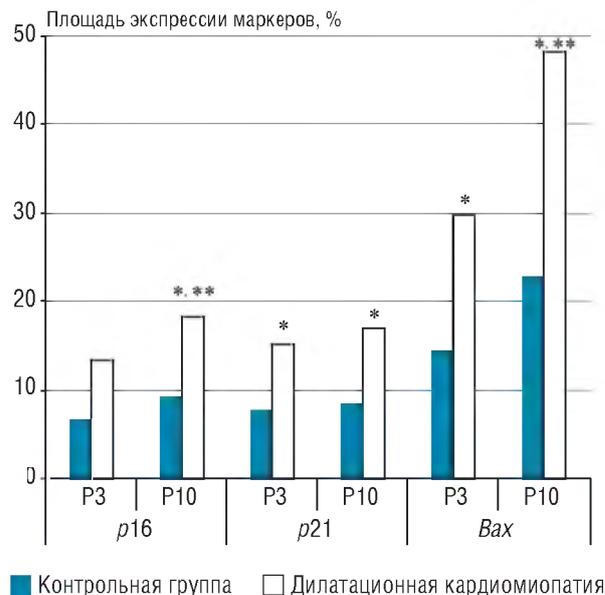


Рис. 2. Экспрессия маркеров апоптоза в культуре кардиомиоцитов в разных пассажах.

\* Отличие от контрольной группы ( $p < 0,05$ );

\*\* отличие от «молодой» культуры ( $p < 0,05$ )

progression of human endometrium-derived mesenchymal stem cells // Tsitologiya. 2016. Vol. 58. № 6. P. 429–435.

6. Bracken A.P., Kleine-Kohlbrecher D., Dietrich N. The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells // Genes. Dev. 2007. Vol. 21. P. 525–530.

7. Collins P.L., Purman C., Porter S.I. et al. DNA double-strand breaks induce H2Ax phosphorylation domains in a contact-dependent manner // Nat. Commun. 2020. Vol. 11. № 1. P. 3158. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16926-x>

8. De Mel S., Hue S.S., Jeyasekharan A.D. et al. Molecular pathogenic pathways in extranodal NK/T cell lymphoma // J. Hematol. Oncol. 2019. Vol. 12. P. 33–39. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0716-7>

9. Elliott P., Andersson B., Arbustini E. et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases // Europ. Heart J. 2008. Vol. 29. P. 270–276. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehm342>

10. Gu J., Wang S., Guo H. et al. Inhibition of p53 prevents diabetic cardiomyopathy by preventing early-stage apoptosis and cell senescence, reduced glycolysis, and impaired angiogenesis // Cell Death Dis. 2018. Vol. 23. № 9. P. 82. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0093-5>

11. Guo Q., Wang D., Liu Z., Li C. Effects of p21 gene down-regulation through rna on antler stem cells in vitro // PLoS One. 2015. Vol. 10. № 8. e0134268. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134268>

12. Guzzo-Merello G., Cobo-Marcos M., Gallego-Delgado M., Garcia-Pavia P. Alcoholic cardiomyopathy // Wld J. Cardiol. 2014. Vol. 6. № 8. P. 771–781. <https://doi.org/10.4330/wjc.v6.i8.771>

13. He S., Sharpless N.E. Senescence in health and disease // Cell. 2017. Vol. 169. № 6. P. 1000–1011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.015>

14. Japp A.G., Gulati A., Cook S.A. et al. The diagnosis and evaluation of dilated cardiomyopathy // J. Amer. Coll. Cardiol. 2016. Vol. 67. № 25. P. 2996–3010. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.03.590>

15. Karimian A., Ahmadi Y., Yousefi B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation af-

ter DNA damage // DNA Repair (Amst.). 2016. Vol. 42. P. 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.04.008>

16. Liu Y., Sanoff H.K., Cho H. et al. Expression of p16Ink4a (INK4a) in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging // Aging Cell. 2009. Vol. 8. № 4. P. 439–48.

17. Lopez-Otin C., Blasco M.A., Partridge L. et al. The hallmarks of aging // Cell. 2013. Vol. 153. № 6. P. 1194–1217.

18. Mijit M., Caracciolo V., Melillo A. et al. Role of p53 in the regulation of cellular senescence // Biomolecules. 2020. Vol. 10. P. 420. <https://doi.org/10.3390/biom10030420>

19. No M.H., Choi Y., Cho J. et al. Aging promotes mitochondria-mediated apoptosis in rat hearts // Life (Basel, Switzerland). 2020. Vol. 10. № 9. P. 178. <https://doi.org/10.3390/life10090178>

20. Peña-Blanco A., García-Sáez A.J. Bax, Bak and beyond — mitochondrial performance in apoptosis // FEBS J. 2018. Vol. 285. № 3. P. 416–431. <https://doi.org/10.1111/febs.14186>

21. Pinto Y.M., Elliott P.M., Arbustini E. et al. Proposal for a revised definition of dilated cardiomyopathy, hypokinetic non-dilat-

ed cardiomyopathy, and its implications for clinical practice: A position statement of the ESC working group on myocardial and pericardial diseases // Europ. Heart J. 2016. Vol. 37. P. 1850–1858. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv727>

22. Prudent J., McBride H.M. The mitochondria-endoplasmic reticulum contact sites: a signalling platform for cell death // Curr. Opin. Cell Biol. 2017. Vol. 47. P. 52–63.

23. Schultheiss H.P., Fairweather D., Caforio A.L.P. et al. Dilated cardiomyopathy // Nat. Rev. Dis. Primers. 2019. Vol. 5. № 1. P. 32. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0084-1>

24. Shimizu I., Minamino T. Cellular senescence in cardiac diseases // J. Cardiol. 2019. Vol. 74. № 4. P. 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2019.05.002>

25. Zhang X., Wu X., Tang W., Luo Y. Loss of p16Ink4a (Ink4a) function rescues cellular senescence induced by telomere dysfunction // Int. J. molec. Sci. 2012. Vol. 13. № 5. P. 5866–5877. <https://doi.org/10.3390/ijms13055866>

Поступила в редакцию 01.05.2021

После доработки 22.08.2021

Принята к публикации 29.08.2021

Adv. geront. 2021. Vol. 34. № 6. P. 885–890

K.P. Kravchenko<sup>1</sup>, K.L. Kozlov<sup>1</sup>, A.O. Drobintseva<sup>2</sup>, D.S. Medvedev<sup>1,3</sup>, V.O. Polyakova<sup>2,4</sup>

#### AGE-ASSOCIATED FEATURES OF THE EXPRESSION LEVEL OF APOPTOSIS MARKERS IN CARDIOMYOCYTES OF PATIENTS WITH DILATED CARDIOMYOPATHY

<sup>1</sup> Saint-Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, 3 Dinamo pr., St. Petersburg 197110;

<sup>2</sup> Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, 2 Litovskaya str., St. Petersburg 194100,

e-mail: anna.drobintseva@gmail.com; <sup>3</sup> Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology FMBA of Russia, bldg. № 93 Kapitovlovo, Vsevolzhsky district, Leningrad region 188663; <sup>4</sup> Belgorod State University, 85 Pobedy str., Belgorod 308015

To understand the pathogenesis of dilated cardiomyopathy (DCMP), it is necessary to establish the molecular-cellular mechanisms of myocardial aging, including those associated with programmed cell death, the molecular mechanisms of which have not been practically studied. The aim of this work is to study markers of apoptosis in cardiomyocytes of patients with DCMP *in vitro*. We used the method of primary dissociated cell cultures and the method of immunofluorescence confocal laser microscopy. Cells of the 3<sup>rd</sup> and 14<sup>th</sup> passages, corresponding to «young» and «old» cultures, were used to simulate cellular senescence. Results. At the molecular level, aging of cardiomyocyte cells was accompanied by a twofold increase in the expression of p16<sup>INK4a</sup> compared to «young cultures» both in the control group and in the group with DCMP. It was also found that the expression of p16<sup>INK4a</sup> in cultures taken from patients with pathology was 2 times higher than in similar cultures from healthy patients. The expression of p21 was increased in the group with DCMP compared to the control; however, with aging of the culture, the expression of p21 did not change, remaining at a significant level. The most significant differences were obtained when comparing the expression of Bax in the cell culture of cardiomyocytes from the group with DCMP in a «young» culture compared with the norm, 3.2 times. Aging of myocardial cells at the molecular level was manifested in an increase in the expression of the Bax protein, which is the triggering mechanism of the mitochondrial apoptosis pathway. It is possible that this pathway of cell death is prevalent in DCMP.

**Key words:** dilated cardiomyopathy, aging of heart cells, regulators of apoptosis, heart muscle disease, molecular markers